

令和元年6月14日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07597

研究課題名(和文) 白-赤-紫のアントシアニン着色における原因遺伝子の変異解析

研究課題名(英文) Mutational analysis of the causative gene in white-red-purple anthocyanin coloration

研究代表者

中務 明 (Nakatsuka, Akira)

島根大学・学術研究院農生命科学系・准教授

研究者番号：40304258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ダイコンの根部着色形質に着目し、赤色と紫色を区別するDNAマーカーの開発を試みた。フラボノイド3'-水酸化酵素遺伝子へレトロトランスポゾンが挿入することで、赤色から紫色へ色素を水酸化できなくなることが明らかとなった。この挿入変異を利用して開発したDNAマーカーは、赤色品種を識別できた。

アントシアニン着色の有無と着色部位の制御について、MYB転写因子との関係を調査した。アントシアニン着色する品種はMYB遺伝子を発現しており、一部の白色品種でエキソンへの塩基挿入によるフレームシフトが確認された。これらの結果は、MYBの遺伝子発現がダイコンの部位別アントシアニン着色を制御していることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アブラナ科(キャベツ・ケール・チンゲンサイ・カラシナなど)の葉色のアントシアニン着色に関してこれまで学術報告があったが、今回新しくダイコン根部着色にMYB遺伝子やF3'H遺伝子が重要であることが遺伝学的・分子生物学的に明らかとなった。また、ダイコン根部着色形質の理解が進んだことで、島根大学で育成された'スサノオ'の地域特産品としての今後の普及が促進されることが期待される。

研究成果の概要(英文)： We focused on the root pigmented trait of radish and tried to develop a DNA marker that distinguishes red and purple root color. Insertion of retrotransposon into the flavonoid 3'-hydroxylase gene revealed that the pigment could not be hydroxylated from red to purple. The DNA marker developed using this insertion mutation could distinguish the red and purple root color cultivar.

The relationship between the presence and absence of anthocyanin and the control of pigmented sites was investigated with the MYB transcription factor. Anthocyanin pigmented cultivars expressed the MYB gene, and some white cultivars showed a frame shift due to the insertion of bases into exons. These results suggested that the gene expression of MYB controls tissue-specific anthocyanin pigmentation of radish.

研究分野：植物分子育種学

キーワード：アントシアニン ダイコン 水酸化 変異遺伝子 DNAマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

園芸作物のアントシアニンによる着色は、鑑賞あるいは食品利用にとって重要である。アントシアニンの合成経路遺伝子はすでに多くの植物で単離されているものの、その分子レベルの知見を園芸作物に適応した例は少ない。一方、島根大学ではハマダイコン (*Raphanus sativus* L. f. *raphanistroides* Makino) を選抜育種により品種改良し、辛味ダイコン新品種「出雲おろち大根」「スサノオ」を育成しており、近年の食の多様化や食品機能性に対する関心から、根部着色形質の導入に関する育種研究も進めている。

## 2. 研究の目的

白・赤・紫の異なる着色形質をもつダイコンを安定的に作出するために、根部の発色がどのような遺伝様式で、どの遺伝子により制御されるか、またその部位別発色はどのように行われているかを明らかにするため、アントシアニン着色形質ならびにその色素合成に関連する遺伝子の解析を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) アントシアニン着色と遺伝子発現

植物材料：紫系品種の「からいね赤」、赤系品種の「長安青丸紅心」および「紅くるり521」ならびに白系品種の「スサノオ」と「耐病総太り」の5品種を供試した。収穫後、組織および器官別（根部表皮組織、木部柔組織および葉）にサンプリングした。遺伝子解析のために各組織および器官は液体窒素で凍結させた後、-80℃で保存した。アントシアニン含量は、塩酸メタノールで抽出した後、クロロホルムによるクロロフィル除去、上澄みのメタノール層を回収し、上澄み溶液の520nmおよび657nmの吸光度を測定した。

アントシアニン合成遺伝子の解析：ダイコン根部からアントシアニン合成経路の関連遺伝子を単離した。カルコン合成酵素 (CHS)・ジヒドロフラバノール還元酵素 (DFR)・フラボノイド3'-水酸化酵素 (F3'H)・アントシアニン合成酵素 (ANS) および転写因子 MYB の遺伝子を単離したのち、RT-PCR による発現解析を行った。遺伝子発現の有無がアントシアニン着色の変化と一致した場合は、色調を制御する候補遺伝子として DNA 構造を解析した。

### (2) F3'H 遺伝子型マーカーの開発

植物材料：実験1の5品種に加え、紫系品種「もみじ」、赤系品種「天安紅心」、「北京紅心」、「春京赤長水」、白系品種「辛丸」、「辛吉」、「夏みの早生3号」、「からいね」、「伊吹大根」を供試した。さらに、根部着色形質の濃淡の異なる紫系統および赤系統を供試した。また遺伝分析のため F<sub>1</sub> および F<sub>2</sub> 集団を赤系品種「長安青丸紅心」と白系品種「スサノオ」の正逆交配を行い、F<sub>1</sub> 種子を獲得した。その F<sub>1</sub> 集団から紫色の根部着色を示す8個体を選抜し、個体ごとに蕾授粉による自家受粉を行い、F<sub>2</sub> 種子を獲得し、根部着色形質を調査した。「長安青丸紅

心' と 'スサノオ' の雑種後代における F<sub>3</sub>H 遺伝子型を調査するために、F<sub>1</sub> 紫色 8 個体、赤色 1 個体、白色 1 個体の計 10 個体、紫色の F<sub>1</sub> の蓄受粉によって得られた F<sub>2</sub>348 個体を供試した。

F<sub>3</sub>H 遺伝子型マーカーによる着色識別： 各植物体の葉から改変 CTAB 法を用いてゲノム DNA を抽出した。根部着色形質に関連する F<sub>3</sub>H 遺伝子型を識別するために 3 つのプライマーを設計し、マルチプレックス PCR を行った。得られた PCR 産物は 0.5 × TBE バッファの 1% アガロースゲルで電気泳動確認した。

### ( 3 ) MYB 遺伝子発現および構造解析

植物材料： cDNA の構造解析には実験 1 と同様の 5 品種を供試し、gDNA の構造解析には、上記の 5 品種に加え白系品種である ' 辛吉 ' と ' 夏みの早生三号 ' の 2 品種も供試した。収穫後、根部表皮組織および葉をサンプリングし、遺伝子解析のために液体窒素で凍結させた後、-80 °C で保存した。

cDNA および gDNA の構造解析： Hot borate 法により着色品種、白系品種の根部皮層組織から cDNA を合成し、配列解析を行った。また改変 CTAB 法により上記の 7 品種の葉から gDNA を抽出し、MYB 遺伝子の全長鎖を単離し、同様に構造解析を行った。

## 4 . 研究成果

### ( 1 ) アントシアニン着色と遺伝子発現

紫系、赤系および白系品種のアントシアニン分析により、紫系品種ではシアニジン系、赤系品種ではペラルゴニジン系のアントシアニンの蓄積が確認されたのに対し、白系品種での蓄積は確認されなかった。紫系品種の根部着色部位から CHS、DFR および ANS 遺伝子の部分配列と F<sub>3</sub>' H および MYB 遺伝子の全長配列を単離し、これらの遺伝子を用いて、紫系、赤系および白系品種の発現解析を行った。その結果、紫系品種ではこれら 5 遺伝子の発現が確認されたが、赤系品種では F<sub>3</sub>H 遺伝子、白系品種では DFR、ANS および MYB 遺伝子の発現は確認されなかった。さらに、赤系品種由来の F<sub>3</sub>H 遺伝子のゲノム構造解析により、第 1 エキソン領域にレトロトランスポゾンの挿入が発見され、この挿入変異に起因する同酵素の機能喪失により根部にペラルゴニジン系色素が蓄積して赤色を呈することが明らかになった。

### ( 2 ) F<sub>3</sub>H 遺伝子型マーカーの開発

実験 1 で判明した sF<sub>3</sub>H の変異領域を用いて、ダイコンの着色に関する変異型 F<sub>3</sub>H アレル検出マーカーを開発した。各種園芸品種、紫系統ならびに赤系統を用いてマルチプレックス PCR により F<sub>3</sub>H アレル解析を行ったところ、正常型の約 450bp の増幅断片は紫系品種および紫系統などから得られたのに対し、変異型の約 750bp のみの増幅断片は赤系品種および赤系統のみで得られた。赤系品種 ' 長安青丸紅心 ' と ' スサノオ ' の交雑後代では、ほぼすべての F<sub>1</sub> 個体は

紫色の根部を示し、正常型と変異型の増幅断片を有していた。その F<sub>2</sub> 集団では、紫色個体は正常型のみまたは正常型と変異型のバンドパターンを示したのに対し、赤色個体は変異型のみバンドパターンを示した。一方、白色個体はいずれかのバンドパターンを示した。

### (3) MYB 遺伝子発現および構造解析

アントシアニン根部着色の有無を判定する DNA マーカーを開発するため、アントシアニン着色する園芸品種から着色関連のある BoMYB2 と高い相同性を示す MYB 遺伝子を単離した。この遺伝子と同じ配列がアントシアニン着色する異なる園芸品種からも単離できた。このダイコン MYB 遺伝子はアントシアニン着色する園芸品種において着色部位で発現しており、ダイコン白色品種の根部表皮と木部柔組織ではほとんど発現していなかったことから、MYB 遺伝子発現とアントシアニン着色が関連していることが示唆された。ゲノム DNA の構造解析を行ったところ、‘からいね赤’ と ‘耐病総太り’ から単離した MYB 遺伝子は 3 つのエキソンと 2 つのイントロンを有しており、エキソン 2 と 3 は品種間でそれぞれ同じ長さであった。エキソン 1 の DNA 結合領域について、白色品種の ‘耐病総太り’ と ‘夏みの早生三号’ のみが 125bp で、他品種の 121bp より 4bp 長く、挿入変異が確認できた。

以上のことより、根部のアントシアニン発色は水酸化酵素 (F3' H) と転写因子 (MYB) が遺伝的に制御しており、白・赤・紫になることが分かった。

## 5. 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] (計 4 件)

Masukawa T., Cheon K.S., Mizuta D., Kadowaki M., Nakatsuka A., and Kobayashi N., Development of mutant *RsF3'H* allele-based marker for selection of purple and red root in radish (*Raphanus sativus* L. var. *longipinnatus* L. H. Bailey), *Euphytica*, 査読有、2019、印刷中

DOI : 10.1007/s10681-019-2442-1

Masukawa T., Kadowaki M., Matsumoto T., Nakatsuka A., Cheon K.-S., Kato K., Tatsuzawa F. and Kobayashi N. Enhancement of food functionality of a local pungent radish “Izumo Orochi Daikon” ‘Susanoo’ by introduction of a colored root character, *Hortic. J.*, 査読有、87 巻、2018、356-363

DOI: 10.2503/hortj.0KD-132

小林伸雄・柘川貴紀・門脇正行・中務 明・伴 琢也 . 地域遺伝資源を活用したハマダイコン新品種 ‘スサノオ’ の育成・普及とその各種形質について、*園芸学研究*、査読有、17 巻、2018、369-375

DOI: 10.2503/hrj.17.369

Masukawa T., Cheon K.S., Mizuta D., Nakatsuka A., and Kobayashi N. Insertion of a retrotransposon into a flavonoid 3'-hydroxylase homolog confers the red root

character in the radish (*Raphanus sativus* L. var. *longipinnatus* L. H. Bailey).  
Hortic. J. 査読有、87 巻、2018、89-96  
DOI:10.2503/hortj.okd-075

[学会発表](計4件)

藤原一樹・中務 明・柘川貴紀・小林伸雄. ダイコン園芸品種におけるアントシアニン着色  
に関する MYB 遺伝子の解析. 園芸学会平成 30 年度中四国支部大会. 2018 年 7 月 21 日.  
(出雲市)

柘川貴紀・中務 明・小林伸雄. 「出雲おろち大根」根部着色新系統の育成と形質評価. 第 9  
回中国地域育種談話会. 2017 年 11 月 25 日 - 26 日 (広島大)

Kobayashi N., Masukawa T., Kadowaki M., Nakatsuka A. and Ban T. Development of new  
variety of local pungent radish “Izumo Orochi Daikon” based on regional genetic  
resources, and contribution to regional agriculture and gastronomy. International  
Symposium on Survey of Uses of Plant Genetic Resources to the Benefit of Local  
Populations. Antananarivo, Madagascar, 18-22 September 2017

柘川貴紀・千 慶晁・磯本光志・中務 明・小林伸雄. ダイコン交配系統の根部着色に関与  
する F3'H 遺伝子型判別マーカーの開発. 園芸学会平成 29 年度春季大会. 2017 年 3 月 19  
日 - 20 日. (日本大)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 小林 伸雄

ローマ字氏名: (KOBAYASHI, Nobuo)

所属研究機関名: 島根大学

部局名: 生物資源科学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 00362426